

Роль метформина как донора оксида азота в регуляции углеводного обмена у пациентов с сахарным диабетом 2 типа

¹Кузнецов И.С., ²Сереженков В.А., ¹Романцова Т.И., ²Ванин А.Ф.

¹ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
(ректор — член-корр. РАМН П.В. Глыбочко)

²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, РАН, Москва
(директор — академик РАН А.А. Берлин)

Цель. Оценка влияния биодоступности оксида азота (NO) на параметры углеводного обмена у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) на фоне терапии метформином и без применения препарата, а также доказательство возможности получения дозозависимого образования NO при метаболизировании метформина в моделях *in vivo*.

Материалы и методы. Для клинической части исследования были сформированы основная и контрольная группы. В основную группу были включены пациенты с впервые диагностированным СД2, которым назначался метформин. В контрольную группу вошли пациенты с СД2 без фармакотерапии заболевания. У пациентов с СД2 были исследованы параметры углеводного обмена и параметры биодоступности NO до и после периода наблюдения. В биологической части исследования мышам внутрибрюшинно вводился метформин в дозах 0,5; 1,1; 5,6 мг на животное, для доказательства возможности получения дозозависимого эффекта препарата. Для анализа появления NO в тканях использовались гидрофобные комплексы железа (Fe) с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) — Fe-(ДЭТК)₂, образующие с NO регистрируемые парамагнитные монокислотные комплексы железа (МНКЖ-ДЭТК). В группе контроля мышам внутрибрюшинно вводился метформин без использования спиновой ловушки.

Результаты. По результатам исследования у пациентов было выявлено параллельное увеличение нитрита и метгемоглобина (показатели биодоступности NO) с улучшением показателей углеводного обмена. В контрольной группе таких параллелей прослежено не было. В моделях *in vivo* на животных выявлена линейная зависимость накопления МНКЖ-ДЭТК от дозы вводимого метформина, а также образование динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) — эндогенных переносчиков NO в контрольной группе.

Заключение. На основании полученных данных был сделан вывод, что метформин, являясь донором NO, положительно влияет на степень компенсации СД2, реализуя свое действие через ДНКЖ.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа; оксид азота; динитрозильные комплексы железа

Metformin regulates glycemic homeostasis in patients with type 2 diabetes mellitus as an NO donor

¹Kuznetsov I.S., ²Serezhnikov V.A., ¹Romantsova T.I., ²Vanin A.F.

¹First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

²Institute of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Aim. To evaluate the influence of metformin on nitric oxide bioavailability in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) regarding glycemic homeostasis, and to investigate a correlation between metformin dosage and NO levels *in vivo*.

Materials and Methods. Two groups — primary and control — were assembled for the clinical section of this study. Patients with newly diagnosed T2DM on metformin therapy were included to the primary group, while drug-naïve T2DM patients were enrolled as control subjects. Glycemic parameters and NO bioavailability was tested in both groups prior to and after the follow-up period. Experimental section was dedicated to the elucidation of potential dose-dependent effects of metformin on NO bioavailability. Mice were intraperitoneally infused with metformin at 0.5; 1.1; 5.6 mg per subject. Tissue detection of NO was performed with diethyldithiocarbamate (DETC) iron complexes to form mononitrosyl iron compounds (MIC) with paramagnetic properties. Control rodents were intraperitoneally infused with metformin without spin trapping.

Results. We found nitrite and methaemoglobin (a marker for NO bioavailability) to increase in parallel along with glycemic compensation in the primary but not control group. *In vivo* rodent models showed linear correlation between accumulation of DETC/MIC and dose of metformin, as well as formation of dinitrosyl iron complexes, known as endogenous NO transporters.

Conclusion. Our data suggests that metformin benefits glycemic homeostasis in T2DM as an NO donor via formation of dinitrosyl iron complexes.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; nitrous oxide; dinitrosyl iron complex

DOI: <http://dx.doi.org/10.14341/2072-0351-816>

В 1998 г. лауреатами Нобелевской премии в области физиологии и медицины стали три американских ученых: Роберт Фарчготт (Robert F. Furchgott), Луис Игнакко (Louis J. Ignarro) и Ферид Мюрад (Ferid Murad). Премия вручена за открытие «Окиси азота как сигнальной молекулы в кардиоваскулярной системе». Факт образования газа в клетке, который, минуя мембраны, может управлять функциями других клеток, был признан неизвестным до той поры новым принципом передачи сигналов в организме. В последнее время оксиду азота (NO) отводится важная роль в регуляции метаболизма практически во всех органах и тканях, как в норме, так и при патологии. Согласно результатам исследований, NO положительно влияет на утилизацию глюкозы периферическими тканями и проведение сигнала инсулина [1]. В то же время до сих пор нет однозначного ответа: какие сигнальные пути вовлечены в проведение сигнала оксида азота вне эндотелиальных клеток сосудов.

Как известно, время жизни NO составляет несколько секунд. Единственным ферментом, на который оксид азота влияет непосредственно, приводя к вазодилатации, является гуанилатциклаза эндотелия сосудов, производящая циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) [2]. На сегодняшний день сделано предположение и об аналогичной роли NO динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) в регуляции биологических процессов по причине их высокой стабильности. Данные структуры имеют формулу $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{L})_2$, где L – лиганд тиоловой природы (цистеин, глутатион или тиоловые группы белка). Лиганды нетиоловой природы – карбоксильная, нитрозильная или имино-группы также могут принимать участие в образовании ДНКЖ, но их стабильность существенно ниже. Увеличение образования динитрозильных комплексов железа наблюдается при возрастании продукции NO в макрофагах, эндотелиальных клетках, нейронах, β -клетках островков Лангенгарса и гепатоцитах [3]. Тиол-содержащие ДНКЖ (как в мономерной, так и димерной форме) положительно влияют на расслабление сосудов и обеспечивают длительное снижение артериального давления у человека. В настоящее время на модели раны крысы показано, что введение низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа с тиоловыми лигандами оказывает ранозаживляющее действие у крыс с эндометриозом. Вводимые ДНКЖ в этом случае активируют апоптоз и полностью блокируют развитие эндометриозного процесса [4–6]. В. D'Autreaux с соавт. в своем исследовании в 2006 г. продемонстрировали роль ДНКЖ в нитрозативном стрессе [7].

Доноры NO положительно влияют на утилизацию глюкозы клетками организма. Так, растворимый донор NO – нитропруссид – оказывает стимулирующее действие на поглощение глюкозы мышцами у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) [8]. В ряде проведенных исследований доказано, что L-аргинин, эндогенный источник NO, также может оказывать положительное влияние на уровень глюкозы при СД2 [9].

В консенсусе совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии больных СД2 важная роль отводится метформину (Мф), как при монотерапии, так и в различных комбинациях с другими пероральными сахароснижающими препаратами (ПССП) и инсулином [10]. В работе В.А. Сереженкова и соавт. [11] в опытах *in vivo* на мышах с использованием спиновой ловушки для NO – диэтилдитиокарбамата (ДЭТК), после внутрибрюшинного введения Мф выявлено образование NO и ДНКЖ. Положительное влияние Мф на биодоступность NO показано и в клинических исследованиях. У пациентов, принимающих Мф в стандартной дозировке 1700 мг, выявляется статистически достоверное увеличение концентрации нитрита (прямого метаболита NO) в плазме и метгемоглобина (результат реакции NO и гемоглобина) в цельной крови наравне с улучшением показателей углеводного обмена [12].

Целью данной работы являлось оценить влияние биодоступности NO на параметры углеводного обмена у пациентов с СД2 на фоне терапии Мф и без применения препарата, а также доказать возможность получения дозозависимого образования NO при метаболизировании Мф в моделях *in vivo*.

Материалы и методы

В серии исследований *in vivo* беспородным мышам весом 20–23 г внутрибрюшинно вводился Мф фирмы Sigma (США). В основной серии опытов Мф вводили в дозе 0,5; 1,1; 5,6 мг на животное. Для улавливания NO в организме мышей использовали гидрофобные комплексы железа (Fe) с ДЭТК ($\text{Fe}-(\text{ДЭТК})_2$), образующие с NO ЭПР-регистрируемые парамагнитные моонитрозильные комплексы железа (МНКЖ-ДЭТК). ДЭТК и Fe вводили через 25 минут после инъекции метформина. Через 15 минут проводили декапитацию животного, извлекаемые ткани (печень и кишечник) весом 300 мг помещали в ампулы диаметром 4 мм и замораживали в жидком азоте для последующего анализа методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В другой серии экспериментов *in vivo* Мф вводили внутрибрюшинно в тех же дозировках, но без введения животным Fe и ДЭТК. Данная серия экспериментов служила контролем, для уточнения возможных реакций NO с эндогенными источниками железа и тиолов.

В клиническую часть исследования было включено 80 пациентов (63 женщин и 17 мужчины) в возрасте $54,5 \pm 5,7$ лет с впервые установленным диагнозом СД2, не получавших терапию по поводу данного заболевания. После первичного обследования была сформирована основная группа – 54 пациента (43 женщины и 11 мужчин) и группа контроля – 26 пациентов (20 женщин и 6 мужчин). Группа контроля была сформирована с учетом возможности наблюдения за пациентами без назначения пероральных сахароснижающих препаратов (ПССП). Гликированный гемоглобин (HbA_{1c}) у пациентов группы контроля составил 6,6–7,0%. Основной группе, помимо рекомендаций по пи-

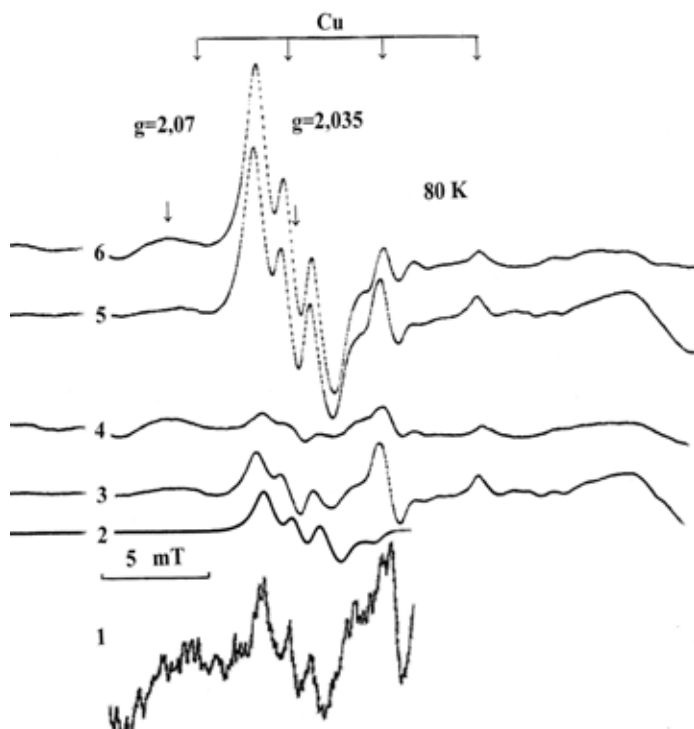


Рис. 1. Спектры ЭПР мононитрозильных комплексов железа (МНКЖ) с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) в кишечнике (спектры №1, 3, 5) и печени (спектры №4, 6). Спектр №2 – модельный комплекс МНКЖ – ДЭТК – Fe – NO в растворе диметилсульфоксида (ДМСО). Температура записи – 77 К. Спектр записан при усилении в 10 раз больше, чем спектры №2, 6. Дозы Мф – 0,5 мг (спектр №1), 1,1 мг (спектры №3, 4), 5, 6 мг (спектры №5, 6).

танию и расширению физической активности, назначался Мф в дозе 1700 мг в сутки. HbA_{1c} основной группы варьировал в пределах 6,6–8,0%. Период наблюдения за пациентами составил 15 недель. До начала основного периода наблюдения и в конце исследования всем пациентам проводилось антропометрические исследования (измерение индекса массы тела (ИМТ), окружности талии (ОТ)). У всех пациентов была взята кровь на HbA_{1c} , общий холестерин, триглицериды, липопротеиды высокой плотности, также методом ЭПР исследовались уровень нитритов, метгемоглобина и нетрансферрин-связанного железа (НСЖ). К концу исследования в основной группе наблюдалось 48 пациентов (41 женщина и 7 мужчин), в контрольной – 17 (13 женщин и 4 мужчины). Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты

В серии опытах *in vivo* в ткани тонкого кишечника и печени после введения Мф в дозе 0,5; 1,1 и 5,6 мг наблюдали накопление комплекса МНКЖ-ДЭТК, которые характеризуются g фактором, равным 2,035. Концентрация NO, включенного в эти комплексы, составила в кишечнике 0,4; 0,89; 17 мкмоль/л, в печени – 0,2; 2,9; 14,3 мкмоль/л соответственно (рис. 1).

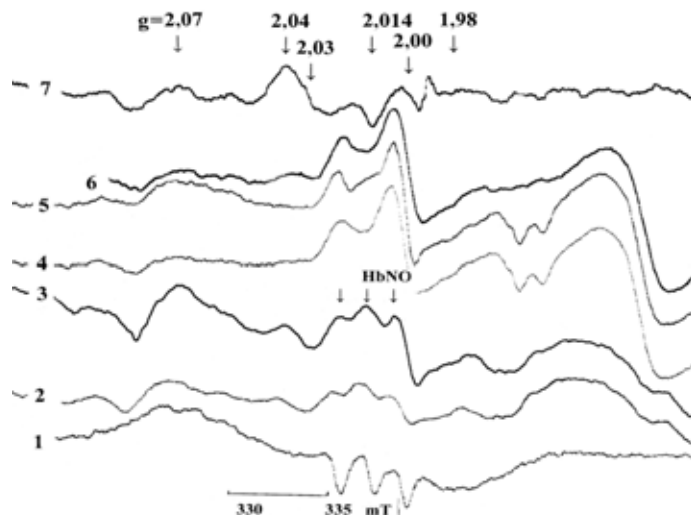


Рис. 2. Спектры ЭПР образцов печени (спектры №4–6) и кишечника (спектры №2, 3, 7) мышей после введения Мф. Опыты проводили в отсутствие ловушки ДЭТК – Fe. Мф вводили в дозе 0,5 мг (спектр №4 – печень), 1,1 мг (спектр №2 – кишечник, №5 – печень), 5,6 мг (спектр №3 – кишечник, спектр №6 – печень). Спектр №7 (усиление при записи в 10 раз выше) представляет собой ЭПР – спектр ДНКЖ (динитрозильного комплекса железа), полученный вычитанием из спектра №2 спектра №1 (ЭПР сигнал гемоглобина).

При введении Мф опытным мышам без Fe и ДЭТК в ткани кишечника в спектре ЭПР наблюдали анизотропный сигнал ДНКЖ с $g_{\text{среднее}} = 2,03$ (рис. 2).

До начала приема Мф у 84,3% пациентов основной группы HbA_{1c} был выше 7,0%, у 15,7% параметр находился в диапазоне от 6,6% до 7,0%. В конце исследования у 68,5% больных уровень HbA_{1c} регистрировался ниже 7,0%, у 31,5% превышал значение 7,0%, однако у всех наблюдаемых отмечалось снижение этого показателя. При измерении уровня нитрита методом ЭПР до момента назначения Мф получены низкие концентрации или полное отсутствие сигнала у некоторых пациентов ($M = 0,1$ мкмоль/л). По истечении срока наблюдения в сыворотке пациентов было отмечено статистически значимое увеличение концентрации нитритов ($0,1 \pm 0,19$ мкмоль/л – изначально, $0,62 \pm 0,14$ мкмоль/л – после), и незначительное увеличение метгемоглобина ($0,98 \pm 0,26$ – изначально, $2,22 \pm 0,69$ мкмоль/л – после лечения) [12]. Стоит добавить, что после назначения Мф, помимо статистически значимого увеличения уровня нитрита в плазме и метгемоглобина в сыворотке, наравне с улучшением показателей углеводного обмена, выявлялись типичные ЭПР – спектры нетрансферрин-связанного железа (рис. 3).

В группе контроля, несмотря на тенденцию к улучшению показателей углеводного обмена и снижению ИМТ, нами не было отмечено увеличения концентрации нитрита в плазме и метгемоглобина в сыворотке крови. На рис. 4 приведено сравнение уровня нитрита пациентов контрольной группы, HbA_{1c} которых после 15-недельного наблюдения оставался в пределах 6,6–7,0%, а также па-

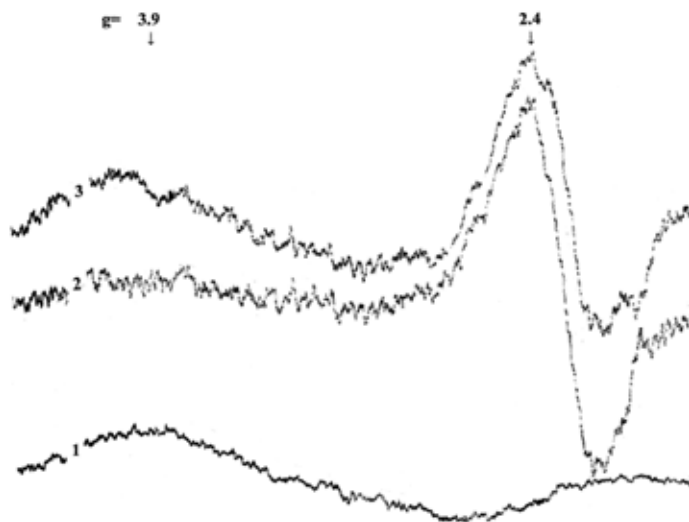


Рис. 3. Типичные спектры ЭПР нетрансферрин-связанного железа в сыворотке пациентов основной группы. Спектр №1 (до лечения метформином), спектры №2, 3 (после лечения).

пациентов основной группы, достигших показателей HbA_{1c} в пределах 6,6–7,0% на фоне назначения Мф (n=14).

Обсуждение

Изучение регуляции внутриклеточных систем, вовлеченных в процесс утилизации глюкозы в условиях инсулинорезистентности (ИР), является одной из ключевых задач, стоящих перед исследователями патогенеза СД2. Многофакторность патогенеза СД2 и его осложнений существенно ограничивает возможность ускоренной разработки и внедрения в клиническую практику новых безопасных групп сенситайзеров инсулина, способных эффективно конкурировать с уже имеющимися на мировом фармакологическом рынке препаратами. С другой стороны, расширение существующих групп препаратов за счет новых химических соединений, с учетом повышения их эффективности, снижения токсичности, разовой

дозы, частоты приема поможет в дальнейшем расширить показания к их применению в ряде клинических ситуаций у пациентов с СД2.

Проведенное исследование показало, что особое внимание может быть сосредоточено вокруг доноров NO. Полученные результаты в биологической части исследования однозначно доказывают, что препарат первой линии в лечении СД2 – Мф является таким донором NO. Согласно общедоступным сведениям по фармакодинамике Мф, за весь период изучения и применения не был определен специфический рецептор препарата. Полученная нами линейная зависимость образования МНКЖ – ДЭТК в печени и кишечнике (рис. 5) в зависимости от дозы вводимого Мф, а также обнаружение динитрозильных комплексов железа (рис. 2) позволяют сделать вывод, что Мф – донор NO, действует не на конкретный рецептор, а через универсальный посредник – ДНКЖ, являющийся внутренним переносчиком эффектов NO.

Доказательством служат результаты клинической части исследования, где показано увеличение концентрации показателей биодоступности NO наряду с улучшением параметров компенсации углеводного обмена у пациентов, находящихся на терапии Мф, и отсутствие такой динамики в группе пациентов с СД2, следующих только рекомендациям по рациональному питанию и расширению уровня физической активности (нефармакологическая терапия). Появление сигнала нетрансферрин-связанного железа интерпретируется как наличие в системе достаточных эквивалентов окислительного стресса, способных поддерживать образование свободных радикалов при СД2.

Принимая во внимание результаты проведенных исследований, в будущем возможен пересмотр классификации препаратов из группы сенситайзеров и выделение отдельной группы ПССП, объединенной эффектом увеличения биодоступности NO у больных СД2.

Авторы декларируют отсутствие конфликта (двойственности) интересов при написании данной статьи.

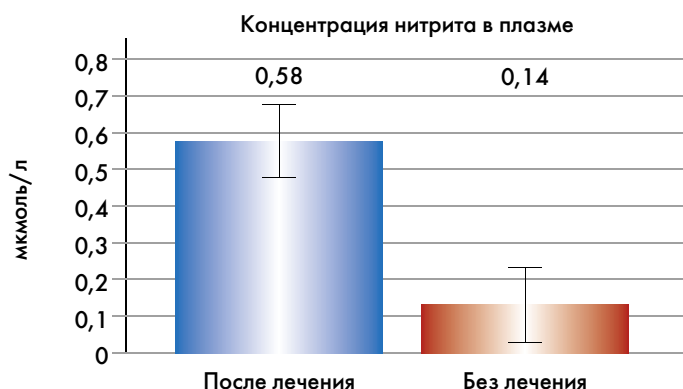


Рис. 4. Концентрация нитрита у пациентов с СД2 (HbA_{1c} 6,6–7,0%) без/после лечения Мф (n=14).

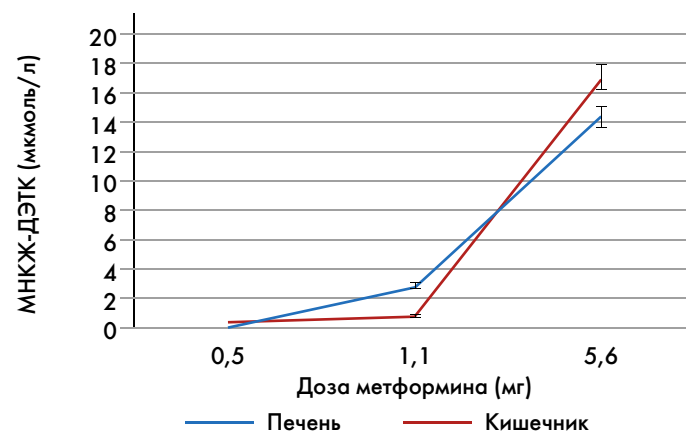


Рис. 5. Зависимость образования МНКЖ–ДЭТК в печени и тонком кишечнике в зависимости от дозы введенного Мф.

Список литературы

1. Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric Oxide Increases Glucose Uptake Through a Mechanism That Is Distinct From the Insulin and Contraction Pathways in Rat Skeletal Muscle. *Diabetes*. 2001;50(2):241–247. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.50.2.241>
2. Nacci C, Tarquinio M, Montagnani M. Molecular and clinical aspects of endothelial dysfunction in diabetes. *Internal and Emergency Medicine*. 2009;4(2):107–116. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11739-009-0234-7>
3. Lewandowska H, Brzóška K, Meczyńska-Wielgosz S, Rumiński K, Wójcik G, Kruszewski M. Dinitrosyl iron complexes-structure and biological functions. *Postepy Biochemii*. 2010;56(3):298–304.
4. Chazov EI, Rodnenkov OV, Zorin AV, Lakomkin VL, Gramovich VV, Vyborov ON, et al. Hypotensive effect of Oxacom(R) containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers. *Nitric Oxide*. 2012;26(3):148–156. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2012.01.008>
5. Сереженков ВА, Ванин АФ, Шехтер АБ, Руденко ТГ, Гаврильчак АВ, Пекшев АВ. Динамика уровня эндогенного и экзогенного оксида азота в тканях раны и органах крыс (ЭПР-спектроскопическая оценка). В мат. науч.-практ. конф. Под ред. Грачева С.В., Шехтер А.Б., Козлова Н.П. Москва; 2001. Стр. 35–40.
6. Велиев ЕИ, Котов СВ, Шишло ВК, Сереженков ВА, Лозинский ВИ, Ванин АФ. Влияние динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами на состояние кавернозных тел пениса у крыс. *Биофизика*. 2008;53(2):326–335.
7. D'Autrèaux B, Horner O, Oddou J-L, Jeandey C, Gambarelli S, Berthomieu C, et al. Spectroscopic Description of the Two Nitrosyl-Iron Complexes Responsible for Fur Inhibition by Nitric Oxide. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(19):6005–6016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ja031671a>
8. Henstridge DC, Drew BG, Formosa MF, Natoli AK, Cameron-Smith D, Duffy SJ, et al. The effect of the nitric oxide donor sodium nitroprusside on glucose uptake in human primary skeletal muscle cells. *Nitric Oxide*. 2009;21(2):126–131. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2009.06.002>
9. Paolisso G, Tagliamonte MR, Marfella R, Verrazzo G, D'Onofrio F, Giugliano D. L-arginine but not D-arginine stimulates insulin-mediated glucose uptake. *Metabolism*. 1997;46(9):1068–1073. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2009.06.002>
10. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Аметов АС, Анциферов МБ, Галстян ГР, Майоров ПЮ, Мкртумян АМ, Петунина НА, Сухарева ОЮ. Консенсус совета экспертов Российской Ассоциации Эндокринологов по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии больных сахарным диабетом 2 типа. *Сахарный диабет*. 2011;(4):6–17.
11. Сереженков ВА, Кузнецов ИС, Романцова ТИ, Кузнецова МИ, Ванин АФ. Антидиабетический препарат «метформин» – донор оксида азота: ЭПР-спектроскопическая оценка эффективности действия «метформина». *Биофизика*. 2011;56(6):1125–1133.
12. Кузнецов ИС, Сереженков ВА, Ванин АФ, Романцова ТИ. Влияние метформина на биодоступность оксида азота у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. *Ожирение и метаболизм*. 2012;(1):29–33.

Кузнецов Иван Сергеевич

аспирант кафедры эндокринологии, ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

E-mail: ISKuznetsov@yandex.ru

Сереженков Владимир Анатольевич

к.б.н., с.н.с. лаборатории физической химии биополимеров, Институт химической физики им Н.Н. Семенова РАН, Москва

Романцова Татьяна Ивановна

д.м.н., проф. кафедры эндокринологии, ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Ванин Анатолий Федорович

д.б.н., проф., руководитель лаборатории физической химии биополимеров, Институт химической физики им Н.Н. Семенова РАН, Москва